

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 C07D 487/04, A61K 31/407, 31/4178, A61P 35/00, 43/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/58312  (43) 国際公開日 2000年10月5日(05.10.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01461  (22) 国際出願日 2000年3月10日(10.03.00)  (30) 優先権データ 特願平11/83591 1999年3月26日(26.03.99) JP  (71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama, (JP)  (72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 杉山 弘(SUGIYAMA, Hiroshi)[JP/JP] 〒162-0842 東京都新宿区市谷砂土原町3-17-1-1-303 Tokyo, (JP) 陶 志福(TAO, Zhi-Fu)[CN/US] 229901 バージニア州 シャーロットビル バージニア州立大学 デパートメント・オブ・ケミストリィ Virginia, (US) 斎藤 烈(SAITO, Isao)[JP/JP] 〒607-8242 京都府京都市山科区勧修寺柴山1-21 Kyoto, (JP)	(74) 代理人 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP)  (81) 指定国 CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title: COMPOUNDS CAPABLE OF CLEAVING DOUBLE-STRANDED DNA AND METHOD OF UTILIZATION OF THE SAME

(54) 発明の名称 2本鎖DNAを切断できる化合物及びその使用方法

(57) Abstract

Novel chemical species capable of simultaneously alkylating double-stranded DNA and cleaving the same; methods for alkylating and cleaving DNA by using these species; and anticancer agents with the use of these compounds. Compounds represented by the following general formula (I) which are capable of simultaneously alkylating double-stranded DNA and cleaving the same; a method for alkylating DNA and a method for cleaving double-stranded DNA by using these compounds; and medicinal compositions with the use of these compounds: B-L-A (I) wherein B represents a chemical structure capable of recognizing the base sequence of DNA, for example, optionally substituted pyrrole-imidazole polyamide; A represents a chemical structure capable of binding to one base of DNA, for example, the alkylation moiety of duocarmycin A; and L represents a linker capable of binding the chemical structures A and B, for example, vinyl.

(57)要約

本発明は2本鎖DNAを同時にアルキル化し、切断し得る新規な化学種を提供するものであり、さらにこれらの化学種を用いたDNAのアルキル化および切断方法を提供するものである。また、本発明はこれらの化合物を用いた抗癌剤を提供するものである。

本発明は、一般式(I)

B-L-A (I)

(式中、BはDNAの塩基配列を認識できる化学構造、例えば置換基を有してもよいピロール-イミダゾールポリアミドを示し、AはDNAの塩基の一種に結合し得る化学構造、例えばデュオカルマイシンAのアルキル化部分を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカー、例えばビニル基を示す。)で表されるDNAの2本鎖を同時にアルキル化し切断することができる化合物、これらの化合物を用いたDNAのアルキル化方法、2本鎖DNAの切断方法、及び、これらの化合物を用いた医薬組成物に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BH バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジ蘭
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルギナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴー
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドバ	TJ タジキスタン
BI ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサオ	共和国	TT トリニタッド・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴー	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW モラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ベトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジニノヴゴロド	YU ユニゴースラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明 紹 書

## 2本鎖DNAを切斷できる化合物及びその使用方法

技術分野

本発明は、化学合成により製造し得る化合物を用いて2本鎖DNAを同時にアルキル化し、切斷し得る化合物、これらの化合物を用いたDNAのアルキル化方法、2本鎖DNAの切斷方法、及び、これらの化合物を用いた医薬組成物に関する。

背景技術

ヒトゲノムプロジェクトにより我々の「生命の設計図」である全遺伝子の塩基配列が数年内に解明されようとしている。この設計図に傷があつたり、後天的に傷がはいると、病気や老化を引き起こすことが知られている。ヒトゲノムプロジェクトの進展により癌を含む多くの疾病はDNAレベル理解されるようになり、診断、予防などを中心とした医学全体が、革命的に変化するものと考えられる。さらに、これらの疾病のDNAレベルでの理解に基づいた治療法、すなわち病因遺伝子やその産物をターゲットとした医薬品の開発への期待も大きいが、基礎研究を臨床研究に活かしていくための橋渡し的な研究はまだ、途についたばかりである。現在、用いられている抗癌剤は、スクリーニングによって選択された抗生素質が多く、もともと癌細胞を殺すために微生物が產生したものではなく、癌の分子生物学的知見に基づいたものはほとんどない。細胞内の特定遺伝子の発現を細胞外から自由自在にコントロールすることが可能になれば、究極の遺伝子レベルでの治療法となると考えられる。

本発明者らは、最近、抗生素質デュオカルマイシンがディスタマイシンなどの他種分子とヘテロダイマーを形成し協同的にDNAの分子認識を行ない、デュオカルマイシン単独の場合とは異なる塩基配列を効率よくアルキル化することを発見した(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93,14405,1996)。この結果をもとにデュオカルマイシンのアルキル化部分にDNA認識部位としてピロールーイミダゾールボ

リアミドを結合させ、任意の塩基配列でDNAを選択的にアルキル化する分子の合成に成功し、特許出願をした（特願平10-260710号）。

しかし、デュオカルマイシンのアルキル化部分にDNA認識部位としてピロール-イミダゾールポリアミドを結合させだけの化合物ではアルキル化能が十分なだけではなく、これらの化合物は1本鎖の塩基配列しか認識できないものであった。

そこで、本発明者らがこれらの化合物の分子動力学などのコンピュータモデリングを用いてこれらの分子とDNAとのアルキル化を詳細に検討すると、デュオカルマイシンの反応性のあるシクロプロパン部分（セグメントA）にビニル基などのリンカーを導入することにより、DNAに対するアルキル化能が増すことが期待できそうであることが判明した。

#### 発明の開示

本発明は、アルキル化能が増大したDNAのアルキル化剤を提供するものである。さらに、本発明者らは、この研究において本発明のアルキル化剤がダイマー様の挙動をとり、2本鎖DNAを同時にアルキル化し切断することを見出し、特定の塩基配列に対して人工の制限酵素としての作用を有するものであることを見出した。

したがって、本発明は2本鎖DNAを同時にアルキル化し、切断し得る新規な化学種を提供するものであり、さらにこれらの化学種を用いたDNAのアルキル化および切断方法を提供するものである。

また、本発明はこれらの化合物を用いた抗癌剤を提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のImPyLDu86とDNAとの反応の結果を示した、図面に代わる写真である。

第2図は、実験に使用したDNAの塩基配列及びImPyLDu86の化学構造を示したものである。

第3図は、本発明の化合物によるDNAの切断サイトを模式的に示したもので

ある。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明は、一般式（I）



（式中、BはDNAの塩基配列を認識できる化学構造を示し、AはDNAの塩基の一種に結合し得る化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンクーを示す。）

で表されるDNAの2本鎖を同時に切断することができる化合物に関する。

また、本発明は、前記の化合物を用いた2本鎖DNAの特定の塩基配列部分をアルキル化する方法、及び2本鎖DNAの特定の塩基配列部分を切断する方法に関する。

さらに、本発明はこれらの化合物を用いた医薬組成物、特に抗癌剤に関する。

本発明の前記一般式（I）における、DNAの塩基配列を認識できる化学構造部分であるBは、置換基を有してもよいピロール及び／又はイミダゾールから誘導される化学構造が好ましい。ピロールやイミダゾールの置換基としては、DNAの塩基配列を認識する妨げとならないものであれば特に制限はなく、例えば、炭素数1～10、好ましくは1～5の直鎖又は分枝状のアルキル基、前記したアルキル基から誘導されるアルコキシ基、水酸基、アミノ基、前記したアルキル基から誘導されるN-アルキル置換アミノ基、有機カルボン酸から誘導されるN-アシルアミノ基、グアニジノ基、置換グアニジノ基などが挙げられる。例えば、N-メチルピロール、N-メチルイミダゾール、3-ヒドロキシピロール、N-メチル-3-ヒドロキシピロールなどが挙げられる。

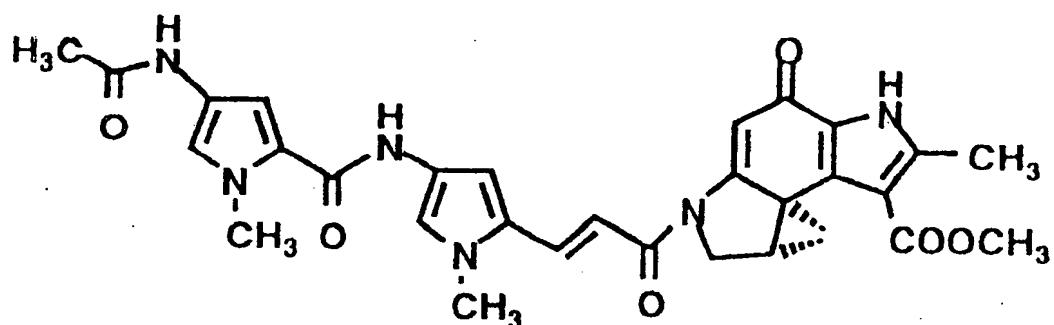
また、DNAの塩基配列を認識できる化学構造部分であるBとしては、より具体的にはピロール-イミダゾールポリアミド結合が好ましい。ピロールやイミダゾールの長さ（個数）は特に制限はないが2～10個、好ましくは2～5個程度である。

DNAの塩基の一種に結合し得る化学構造部分であるAとしては、シクロプロパン環を有する化学構造が好ましく、デュオカルマイシンのアルキル化部分がよ

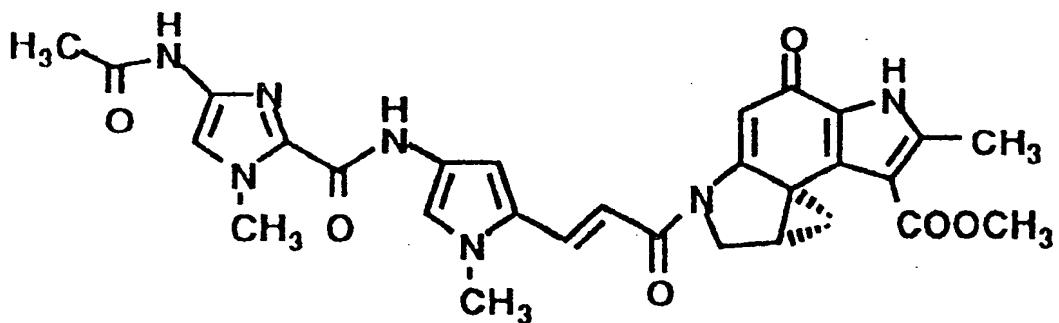
り好ましい。

A 及び B の化学構造を結合させ得るリンカーパート L としては、セグメント A とセグメント B とを適當な距離に隔てることができ、かつ、アルキル化活性を失活させないものが好ましい。好ましい具体例としてはビニル基を含有する化学構造が挙げられる。

一般式 (I) で表される本発明の化合物の好ましいものとしては、次式



で表される化合物（以下、「PyPyLDu86」という。）、又は



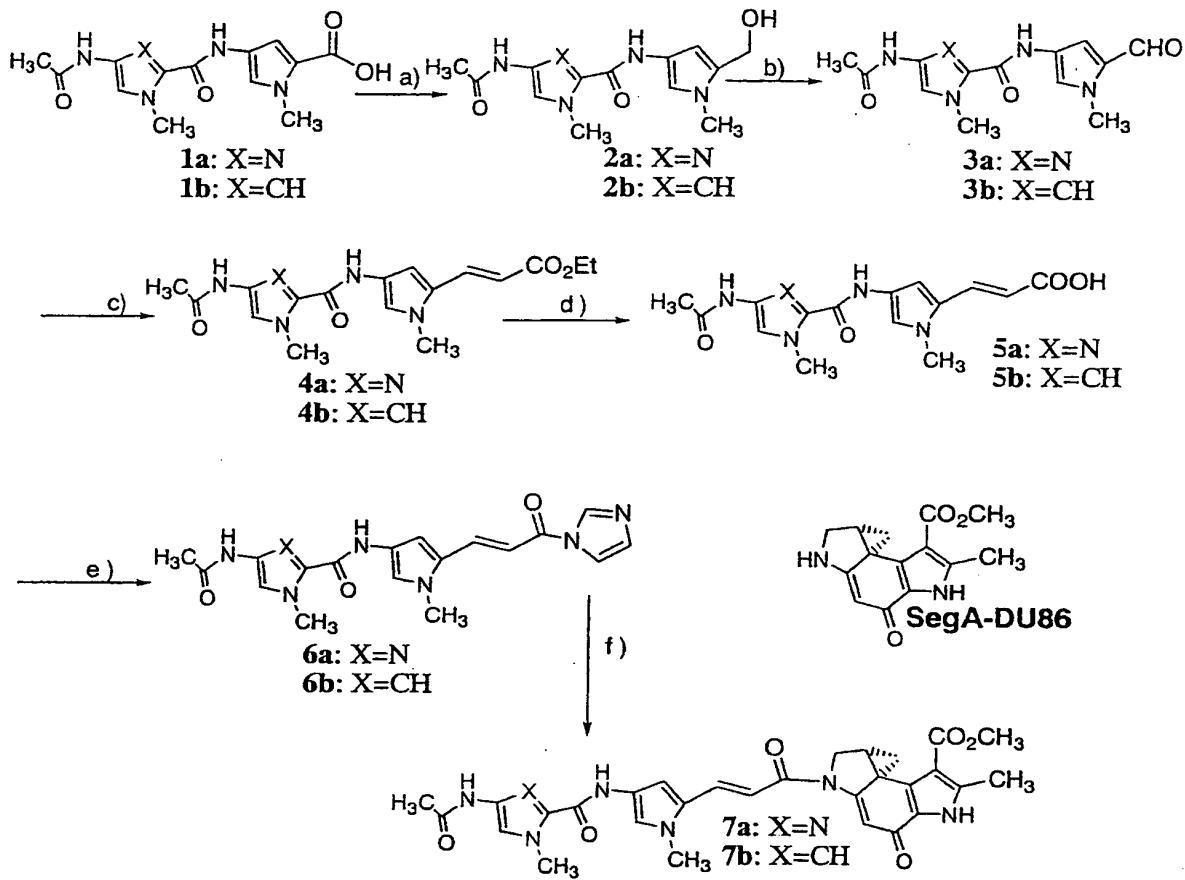
で表される化合物（以下、「ImPyLDu86」という。）が挙げられる。

前記した化合物は、塩基配列 T G A C G 若しくは C G A C G 又はそれらの相補鎖を認識する。

本発明の一般式 (I) で表される化合物は、公知の方法に準じて製造することができる。即ち、A セグメント及び B セグメントを常法により製造し、これに順次リンカーセグメント L を結合させ、次いで残りのセグメントを結合させること

により製造することができる。

例えば、前記の I m P y L D u 8 6 (7a) 及び P y P y L D u 8 6 (7b) の製造例を次の化学反応式で示す。反応式中の各化合物の下の数字は化合物の番号を示す。



反応式中の a ) はベンゾトリアゾールー 1 - イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート (BOP) の THF 溶液での処理、次いで  $\text{NaBH}_4$  处理を示し、 b ) は THF 中での  $\text{MnO}_2$  处理を示し、 c ) は THF 中でのトリエチルホスホノアセテート及び  $\text{NaH}$  处理を示し、 d ) は水メタノール中での水酸化ナトリウムによる処理を示し、 e ) は DMF 中での 1 , 1 - カルボニルジイミダゾールでの処理を示し、 f ) は DMF 中での水素化ナトリウムを用いた DU86 のセグメント A との処理を示す。

こうして合成された PyPyLDu86 および、 ImPyLDu86 の DNA との反応性を調べた。 ImPyLDu86 によるアルキル化の結果を第 1 図に示した。この実験に用いた DNA 及び使用した ImPyLDu86 を第 2 図に示す。

左側の泳動図は 2 本鎖 DNA の上のストランドの結果、右側の泳動図は下のストランドの結果である。アルキル化の位置は加熱により切断バンドとしてみることができる。その結果、低濃度から主に 2 本鎖 DNA はサイト 1 とサイト 2 で 2 本鎖が切断されていることがわかり、アルキル化が 2 本鎖で同時に起っていることが判断できる。このような切断を引き起こす化合物はこれまでに例がなく、まさに人工の制限酵素ということができる。また用いた ImPyLDu86 の量から 70 % の高率で切断が起っていることが判明し、以前に合成した分子（特願平 10-260710 号参照）にくらべて非常に高い効率であることがわかる。

2 本鎖で同時にアルキル化が起った原因是、第 3 図に示すように、 ImPyLDu86 が 2 量体を形成しリンカー部分とイミダゾールがよいスタッキングすることにより GC 塩基対を認識して、このものが 2 本鎖 DNA の認識配列に特異的に結合して、起きているものと考えられる。これらの結果、分子設計により提案され導入したリンカーは反応性も向上させ、またイミダゾールとのペアによる認識ユニットとしても利用できることが明らかになった。これらの知見に基づいて DNA の特定配列をターゲットとする新しいタイプの遺伝子治療薬の分子設計に一步近づいたと言える。

次に、本発明の化合物の前記した性質に基づく抗細胞活性を検討した。即ち、本発明の PyPyLDu86 、 ImPyLDu86 と、抗癌剤として公知のデュオカルマイシン A について HeLa S<sub>3</sub> 細胞（子宮頸部扁平上皮癌細胞）の抗細胞活性を試験した。結果を表 1 に示す。この結果、本発明の化合物はデュオカルマイシン A に比べて約 3 ~ 7 倍の活性があることがわかった。

本発明の化合物は抗癌剤として有用であり、製薬上許容される医薬担体と共に医薬組成物とすることができます。本発明の医薬組成物は、経口投与又は非経口投与により症状に応じて投与することができる。本発明の医薬組成物の有効投与量は、患者の状態や症状などにもよるが、通常は 1 μg ~ 100 mg / kg / 日の範囲で適宜選択することができる。また、本発明の医薬組成物は通常の方法によ

り、注射剤などに製剤化することができる。

### 実施例

次に実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

以下の実施例において使用される試薬の略称は次のとおりである。

D I E A : N , N - ジイソプロピルエチルアミン、

D M F : N , N - ジメチルホルムアミド、

T H F : テトラヒドロフラン、

B O P : ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム、ヘキサフルオロホスフェート。

以下の実施例においては、反応の進行を 0 . 2 5 m mシリカゲル 6 0 プレートを用いた薄層クロマトグラフィー (T L C ) で 2 5 4 n m の蛍光インジケーター (メルク社製) によって追跡した。T L C プレートは U V によって観察した。

N M R スペクトルは、テトラメチルシランを内部標準とし、H<sup>1</sup>-N M R スペクトルの化学シフトは p p m で表記した。

E I (E l e c t r o n i m p a c t) マススペクトルは、J N M - A X 5 0 5 を用い、E S I M S (E l e c t r o s p r a y i o n i z a t i o n mass spectra) は、P E S C I E X A P I 1 6 5 を用いて測定した。

E x T a q D N A ポリメラーゼとフィルターチューブ (S u p r e c - 0 2 ) は、宝酒造から、t h e r m o s e q u e n a s e c o r e s e q u e n c i n g k i t とローディング色素 (フューションレッドのD M F 溶液) はアマシャム社から、5' エンドテキサスレッド修飾D N A オリゴマー (1 8 m e r ) はクラボウ社から、5 0 % ロングレンジャー (登録商標) ゲル溶液はF M Cバイオプロダクト社からそれぞれ購入した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、H I T A C H I 5 5 0 0 - S D N A

Sequencerを用いて行った。

#### 実施例 1：化合物 2 a (X = N) の製造

T H F 3 0 m l 中に化合物 1 a 2 0 4 . 8 m g (0 . 6 7 m m o l ) 、 B O P 3 2 6 . 3 m g (0 . 7 4 m m o l ) 1 7 0 m l 、 N a B H 4 9 8 m g (2 . 5 9 m m o l ) を加えた。この反応溶液を室温下で 3 時間反応させた後、溶媒を減圧留去して得られた残渣に C H 3 O H 2 0 m l と水 5 m l を加えた。この溶液を 1 時間攪拌し、透明な溶液を得た。減圧下で溶媒を留去し、黄色の残渣を C H 3 O H と C H 2 C l 2 を用いたフラッシュクロマトグラフィーにより精製して収量 9 2 . 6 m g の目的の化合物 2 a を収率 4 7 . 4 % で得た。

<sup>1</sup>H N M R (D M S O - d<sub>6</sub>) δ

10.24 (s, 1H), 9.62 (s, 1H), 7.38 (s, 1H),  
7.10 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.09 (d, J=2.0Hz, 1H),  
4.86 (t, J=5.5Hz, 1H), 4.34 (d, J=5.5Hz, 2H),  
3.93 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 2.01 (s, 3H).

#### 実施例 2：化合物 2 b (X = C H) の製造

化合物 2 b は化合物 2 a と同様の方法で収率 6 8 . 5 % で得た。

<sup>1</sup>H N M R (D M S O - d<sub>6</sub>) δ

9.76 (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 7.10 (d, J=2.0Hz, 1H),  
7.05 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.78 (d, J=2.0Hz, 1H),  
6.01 (d, J=2.0Hz, 1H), 4.82 (t, J=5.5Hz, 1H),  
4.34 (d, J=5.5Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.53 (s, 3H),  
1.96 (s, 3H).

#### 実施例 3：化合物 3 a (X = N) の製造

T H F 3 0 m l 中に化合物 2 a 8 5 m g (0 . 2 9 m m o l ) 、活性化された M n O<sub>2</sub> (8 5 %) 5 5 0 m g を加え、室温下で 1 . 5 時間攪拌した後、ろ過した。溶媒を減圧留去して得られた残渣を <sup>1</sup>H N M R を測定し、次の反応に直接使

うのに十分な純度であり、さらに精製する必要がないことを確認した。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ

10.21 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 9.50 (s, 1H),  
7.63 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.10 (d, J=2.0Hz, 1H),  
3.94 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.02 (s, 3H).

#### 実施例4：化合物3b (X=CH) の製造

化合物3bは化合物3aと同様の方法で得られた。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ

9.99 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 9.49 (s, 1H),  
7.57 (s, 1H), 7.14 (d, J=1.0Hz, 1H),  
6.98 (d, J=1.0Hz, 1H), 6.88 (d, J=2.0Hz, 1H),  
3.87 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 1.97 (s, 3H).

#### 実施例5：化合物4a (X=N) の製造

氷冷下で、THF 6mlにNaH (60%) 23.1mg (0.58mmol) を溶解させ、さらにトリエチルホスホノアセテート 116mlを加えた。この反応溶液を5分間攪拌した後、THF 25mlに溶解した化合物3aを加え、終夜反応させた。THFを減圧留去し、得られた残渣から酢酸エチルを用いたフラッシュクロマトグラフィーにより収量88.5mgの黄色の固体の化合物4aを収率84%で得た（化合物2aからの2段階での収率）。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ

10.25 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 7.51 (d, J=15.9Hz, 1H),  
7.44 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.42 (s, 1H),  
6.84 (d, J=1.8Hz, 1H), 6.11 (d, J=15.9Hz, 1H),  
4.16 (q, J=7.0Hz, 2H), 4.13 (s, 3H), 3.70 (s, 3H),  
2.02 (s, 3H), 1.24 (t, J=7.0Hz, 3H).

#### 実施例6：化合物4b (X=CH) の製造

化合物 4 b は化合物 4 a と同様の方法で収率 55 % で得た。

<sup>1</sup>H N M R (DMSO-d<sub>6</sub>) δ

9.87 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 7.51 (d, J=15.5Hz, 1H),  
 7.39 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.13 (d, J=2.0Hz, 1H),  
 6.85 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.73 (d, J=2.0Hz, 1H),  
 6.07 (d, J=15.5Hz, 1H), 4.16 (q, J=7.0Hz, 2H),  
 3.82 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 1.97 (s, 3H),  
 1.23 (t, J=7.0Hz, 3H).

#### 実施例 7：化合物 5 a (X = N) の製造

CH<sub>3</sub>OH 5 ml 中に化合物 4 a 70 mg (0.2 mmol)、2N 稀 NaOH 1.5 ml と水 3 ml を加えた反応溶液を室温下で 4.5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去により除去した後、水 20 ml を加えた。この溶液をろ過し、ろ液を 2N HCl により pH 2 ~ 3 にした。これにより得られたゲル状の沈殿物をろ過し、収量 43 mg で化合物 5 a を収率 67 % で得た。

<sup>1</sup>H N M R (DMSO-d<sub>6</sub>) δ

10.24 (s, 1H), 9.84 (s, 1H), 7.43 (d, J=15.0Hz, 1H),  
 7.41 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.78 (s, 1H),  
 6.03 (d, J=15.0Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.67 (s, 3H),  
 3.86 (s, 3H);

E S I M S m/e C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>として；計算値 (M - H) 330.3

実測値 330.2

#### 実施例 8：化合物 5 b (X = CH) の製造

化合物 5 b は化合物 5 a と同様の方法で収率 57 % で得た。

<sup>1</sup>H N M R (DMSO-d<sub>6</sub>) δ

9.83 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 7.38 (d, J=16.0Hz, 1H),  
 7.34 (s, 1H), 7.13 (d, J=2.0Hz, 1H),  
 6.84 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.64 (s, 1H),

5.99 (d, J=16.0Hz, 1H), 3.82 (s, 3H),  
3.65 (s, 3H), 1.99 (s, 3H);

E S I M S m/e C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>として; 計算値 (M - H) 329.3  
実測値 329.4

#### 実施例 9 : 化合物 6 a (X = N) の製造

D M F 2 m l 中に化合物 5 a 26.4 m g (0.08 mmol)、1,1' - カルボキシリジイミダゾール 49.9 m g (0.31 mmol) を加えた。この反応溶液を室温下で終夜攪拌した後、水 20 m l を加え、ろ過して黄色の沈殿物として化合物 6 a を収量 20.5 m g 収率 68 % で得た。

<sup>1</sup>H N M R (D M S O - d<sub>6</sub>) δ  
10.23 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 8.67 (s, 1H),  
7.90 (d, J=1.0Hz, 1H), 7.88 (d, J=15.5Hz, 1H),  
7.50 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.44 (s, 1H),  
7.32 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.16 (d, J=15.5Hz, 1H),  
7.10 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.79 (s, 3H),  
2.03 (s, 3H);

E S I M S m/e C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>として; 計算値 (M - H) 380.4  
実測値 380.4

#### 実施例 10 : 化合物 6 b (X = C H) の製造

化合物 6 b は化合物 6 a と同様の方法で収率 80 % で得た。

<sup>1</sup>H N M R (D M S O - d<sub>6</sub>) δ  
10.1 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 8.68 (s, 1H),  
7.91 (t, J=2.0 and 2.0Hz, 1H),  
7.87 (d, J=15.0Hz, 1H), 7.48 (d, J=2.0Hz, 1H),  
7.22 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.16 (d, J=1.5Hz, 1H),  
7.14 (d, J=15.0Hz, 1H), 7.10 (s, 1H),  
6.89 (d, J=1.5Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.78 (s, 3H),

1.97 (s, 3H);

E S I M S m/e C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>として; 計算値 (M - H) 379.4  
実測値 379.4

### 実施例 1 1 : 化合物 7 a (X = N) の製造

-50°CにおいてDMF 0.3ml中に水素化ナトリウム(60%)3.2mg(0.08mmol)を溶解させた溶液を、DMF 0.3mlにDU86のセグメントA 6.1mg(0.024mmol)を溶解させた溶液を加えた。この反応溶液を-50~-40°C下で3時間攪拌した後にDMF 1mlに化合物6a 10.8mg(0.028mmol)を溶解させた溶液を-50°C下で加えて、更に-40°C下で5時間攪拌した後、-30°Cに保つ冷凍庫で2日間置いた。その後、リン酸ナトリウム緩衝液(0.01M)3mlを加えて、室温下で5分間攪拌した。溶媒を減圧留去して得られた黄色の残渣をCH<sub>3</sub>OHとCHCl<sub>3</sub>を用いたフラッシュクロマトグラフィーにより精製して収量12.3mgの化合物7aを収率91%で得た。

<sup>1</sup>H N M R (DMSO-d<sub>6</sub>) δ

12.36 (s, 1H), 10.24 (s, 1H), 9.97 (s, 1H),  
7.58 (d, J=15.0Hz, 1H), 7.43 (s, 1H),  
7.41 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.99 (d, J=2.0Hz, 1H),  
6.85 (s, 1H), 6.58 (d, J=15.0Hz, 1H),  
4.29 (d, J=10.5Hz, 1H),  
4.19 (dd, J=5.0Hz and 4.5Hz, 1H), 3.95 (s, 3H),  
3.73 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.46 (m, 1H),  
2.47 (s, 3H), 2.08 (m, 1H), 2.02 (s, 3H),  
1.29 (t, J=4.5 and 3.5Hz, 1H);

E S I M S m/e C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>として; 計算値 (M - H) 570.6  
実測値 570.4

### 実施例 1 2 : 化合物 7 b (X = C H) の製造

化合物 7 b は化合物 7 a と同様の方法で収率 77 % で得た。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ

12.36 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 9.80 (s, 1H),  
 7.57 (d, J=15.0Hz, 1H), 7.38 (d, J=1.5Hz, 1H),  
 7.14 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.88 (d, J=1.5Hz, 1H),  
 6.86 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.84 (s, 1H),  
 6.56 (d, J=15.0Hz, 1H), 4.29 (d, J=10.5Hz, 1H),  
 4.19 (dd, J=4.0 and 4.5Hz, 1H), 3.83 (s, 3H),  
 3.73 (s, 1H), 3.71 (s, 1H), 3.46 (m, 1H),  
 2.47 (s, 3H), 2.09 (m, 1H), 1.97 (s, 3H),  
 1.29 (t, J=4.5 and 3.5Hz, 1H);

ESIMS m/e C<sub>30</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>として；計算値 (M-H) 569.6

実測値 569.5

### 実施例 13：450 bp のDNAフラグメントのアルキル化

(1) 5' - テキサスレッド - 末端修飾 450 塩基対 DNA フラグメントの合成。

5' - テキサスレッド - 末端修飾 450 bp DNA フラグメント pUC18 F780\*-1229 と pUC18 R1459\*-1908 (これらは相補的配列) は、 5' - 末端テキサスレッド修飾 18mers をプライマーとして用いた PCR 法により製造され、 Suprec-02 によって精製された。これらの濃度はエチチュウムプロマイド染色法によって決定された。アスタリスク (\*) はテキサスレッド修飾位置を示し、 数字は複製開始点からのヌクレオチド番号を示している。この塩基配列を配列表の配列番号 1 及び 2 に示す。

(2) 高分解能ポリアクリルアミドゲル電気泳動。

全量 10 μl のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 12.5 mM 中に 5' 末端がテキサスレッドでラベルされた DNA フラグメント 60 nM、 DMF 5% (v/v) とさまざまな濃度の薬剤を含む標準反応溶液を微量遠心分離管 (Ependorf) に入れて室温下で一晩温置した後、 calf thymus DNA (5 mM, 1 μl) を加えて、 90 °C、 5 分間加熱した。DNA はエタノ

ール沈殿により得られた。得られたDNAはローディング色素（フューシンレッドのDMF溶液）8μlに溶解させた。サンプル溶液はDNAを変性させるため、94°C、20分温置した後、すぐに0°Cに冷却した。2μlについて、5500-S DNA sequencer systemを用いた、6% ロングレンジャー（登録商標）を用い、ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動にかけられた。

#### 実施例14：HeLa S<sub>3</sub>細胞生育阻害試験

24穴カルチャープレートの各ウェルに10%牛胎児血清および2mMグルタミンを含むMEM培地で $2.67 \times 10^4$ 個/m<sup>2</sup>に調整したHeLa S<sub>3</sub>細胞を0.75mlずつ分注した。炭酸ガスインキュベーター内で一晩37°Cで培養後、培地により適宜希釈した表1に示す各試験化合物を0.25mlずつ各ウェルに加えた。

炭酸ガスインキュベーター内で細胞を72時間培養後、培養上清を除去し、トリプシン・エチレンジアミン四酢酸（EDTA）溶液で細胞を分散、回収した。セルカウンターで細胞数を測定し、無処理での細胞数と既知濃度の試験化合物で処理した場合の細胞数を比較することにより、細胞の増殖を50%阻害する試験化合物の濃度（IC<sub>50</sub>）を算出した。その結果を下表に示す。

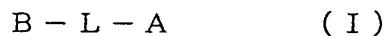
試験化合物	IC <sub>50</sub> (nM)
PyPyLDu86	1.5
ImPyLDu86	0.7
デュオカルマイシンA	4.7

#### 産業上の利用可能性

本発明は、2本鎖のDNAを同時にアルキル化又は切断することができる合成可能な化合物を提供するものであり、人工の制限酵素として有用なばかりでなく、特定の塩基配列をターゲットとして遺伝子治療において有用なものである。

## 請求の範囲

## 1. 一般式 (I)



(式中、BはDNAの塩基配列を認識できる化学構造を示し、AはDNAの塩基の一種に結合し得る化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

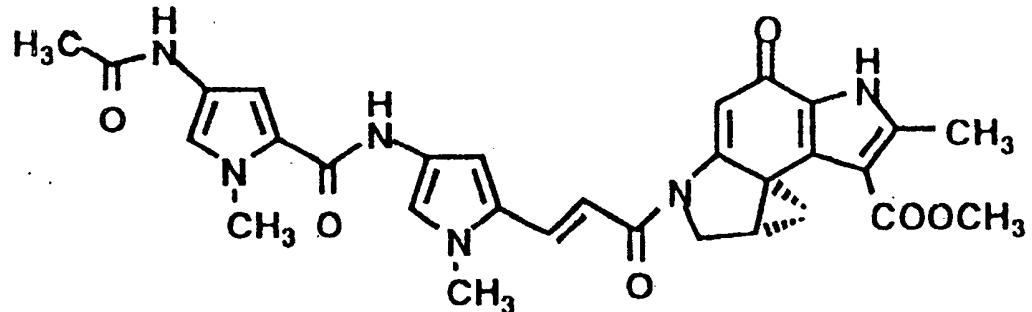
で表されるDNAの2本鎖を同時に切断することができる化合物。

2. DNAの塩基配列を認識できる化学構造が、置換基を有してもよいピロール及び／又はイミダゾールから誘導される化学構造である請求の範囲第1項に記載の化合物。

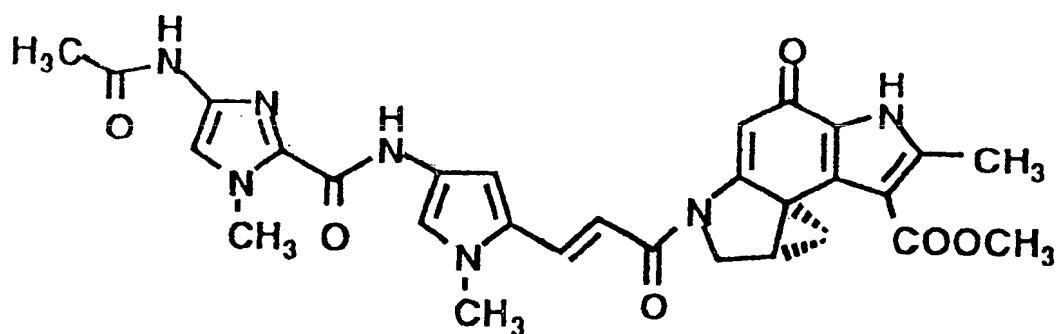
3. DNAの塩基の一種に結合し得る化学構造が、シクロプロパン環を有する化学構造である請求の範囲第1項又は第2項に記載の化合物。

4. A及びBの化学構造を結合させ得るリンカーが、ビニル基を含有する化学構造である請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載の化合物。

5. 一般式 (I) で表される化合物が次式



又は



で表される化合物である請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載の化合物。

6. 請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の化合物を用いて、2本鎖DN  
Aの特定の塩基配列部分をアルキル化する方法。

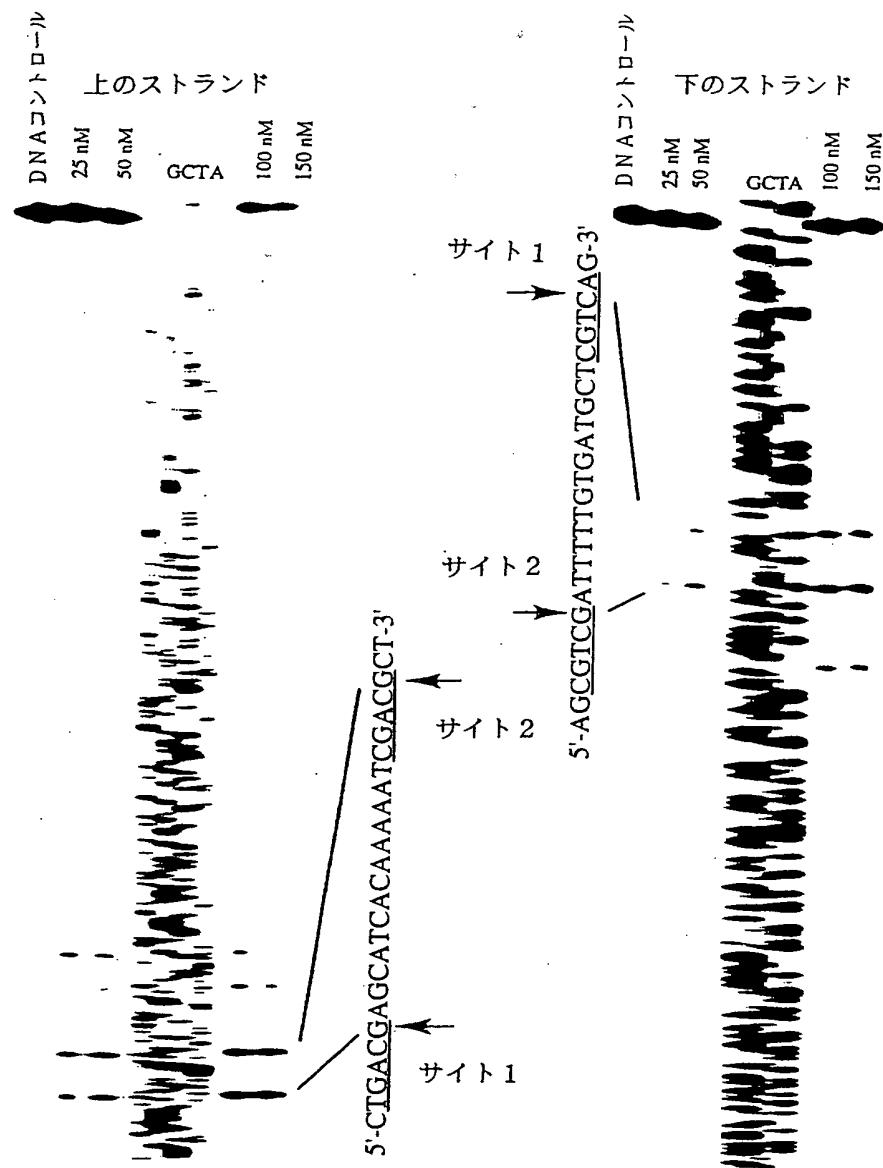
7. 請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の化合物を用いて、2本鎖DN  
Aの特定の塩基配列部分を切断する方法。

8. 特定の塩基配列が、T G A C G若しくはC G A C G又はそれらの相補鎖であ  
る請求の範囲第6項又は第7項に記載の方法。

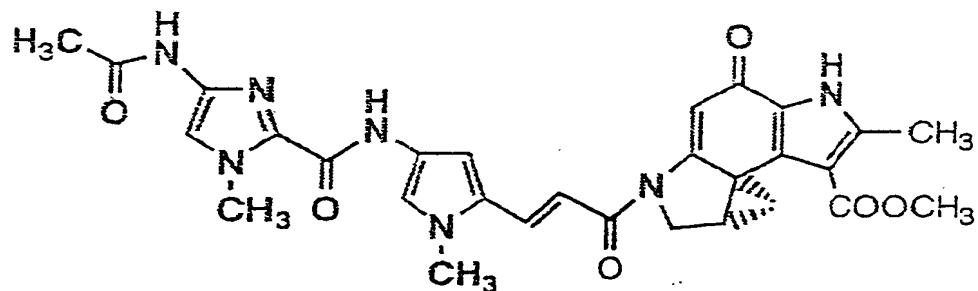
9. 請求の範囲第1項から第5項のいずれかに記載の化合物及び製薬上許容され  
る担体からなる医薬組成物。

10. 癌の治療薬である請求の範囲第9項に記載の医薬組成物。

第 1 図



## 第 2 図



5'- AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA  
3'- TCTTAGTCCC CTATTGCGTC CTTTCTTGTA CACTCGTTT CCGGTCGTTT

AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTT CCATAGGCTC  
TCCGGTCCTT GGCATTTTC CGCGCAACG ACCGCAAAA GGTATCCGAG

↓ サイト1 ↓ サイト2  
CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG  
GCGGGGGGAC TGCTCGTAGT GTTTTTAGCT GCGAGTTCA G TCTCCACCGC

↑ ↑  
AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC  
TTTGGGCTGT CCTGATATTT CTATGGTCCG CAAAGGGGAA CCTTCGAGGG

TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC  
AGCACGCGAG AGGACAAGGC TGGGACGGCG AATGGCCTAT GGACAGGGCG

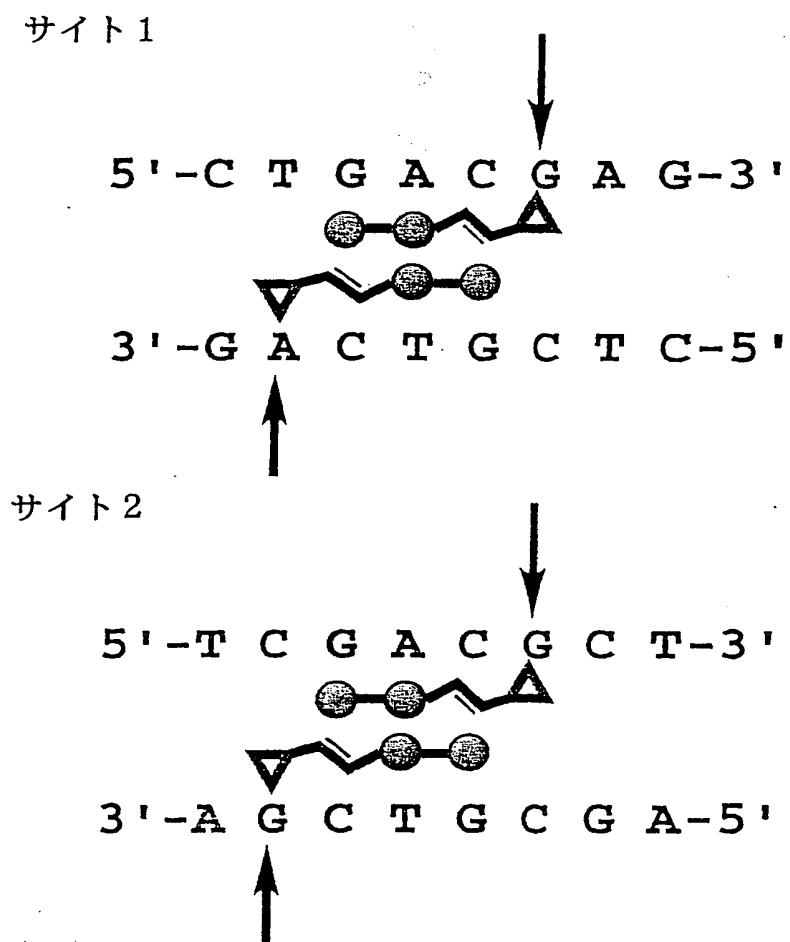
TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CAATGCTCAC GCTGTAGGTA  
AAAGAGGGAA GCCCTTAGCA CCGCGAAAGA GTTACGAGTG CGACATCCAT

TCTCAGTTCG GTGTAGGTCTG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAAC  
AGACTCAAGC CACATCCAGC AAGCGAGGTT CGACCCGACA CACGTGCTTG

CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACTA TCGTCTTGAG  
GGGGCAAGT CGGGCTGGCG ACGCGGAATA GGCCATTGAT AGCAGAACTC

TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA-3'  
AGGTTGGGCC ATTCTGTGCT GAATAGCGGT GACCGTCGTC GGTGACCATT-5'

## 第 3 図



## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> Compound to cleavage double-stranded DNA and their use

<130> JA903009

<150> JP 11-83591

<151> 1999-3-26

<160> 2

<210> 1

<211> 450

<212> DNA

<213> pUC 18

<400> 1

agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	60
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgaaaa ccataggctc cgccccctg acgagcatca	120
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	180
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata	240
cctgtccgcc tttctccctt cggaaagcgt ggcgcattct caatgctcac gctgttaggta	300
tctcagttcg gtgttaggtcg ttcgcctcaa gctggcgtgt gtgcacgaac ccccgttca	360
gccccgaccgc tgccgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga	420
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa	450

<210> 2

<211> 450

<212> DNA

<213> pUC 18

<400> 2

tcttagtccc ctattgcgtc ctttcttgta cactcggtt ccggtcgtt tccggtcctt 60  
ggcatttttc cggcgcaacg accgcaaaaa ggtatccgag gcggggggac tgctcgtagt 120  
gttttttagct gcgagttcag tctccaccgc tttgggctgt cctgatattt ctatggtccg 180  
caaaggggga ctttcgaggg agcacgcgag aggacaaggc tgggacggcg aatggcctat 240  
ggacaggcgg aaagagggaa gcccttagca cgcgaaaga gttacgagtg cgacatccat 300  
agactcaagc cacatccagc aagcgagggtt cgacccgaca cacgtgcttggggcaagt 360  
cgggctggcg acgcggaata ggccattgat agcagaactc aggttgggcc attctgtgct 420  
aatagcggt gaccgtcgta ggtgaccatt 450

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01461

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 Int.Cl<sup>7</sup> C07D487/04, A61K31/407, 31/4178, A61P35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 Int.Cl<sup>7</sup> C07D487/04, A61K31/407, 31/4178, A61P35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 CA (STN)  
 REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, P	NOBUYOSHI AMISHIRO, SATORU NAGAMURA, EIJI KOBAYASHI, AKIHIKO OKAMOTO, KATSUSHIGE GOMI, HIROMITSU SAITO, "Synthesis and Antitumor Activity of Duocarmycin Derivatives: A-Ring Pyrrole Compounds Bearing 5-Membered Heteroarylacryloyl Groups", Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1999, Vol.47, No.10, p.1393-1403	1-10
A	WO, 97/44000, A2 (PANORAMA RESEARCH INC), 27 November, 1997 (27.11.97) & US, 5843937, A	1-10
A	WO, 96/23497, A1 (Synphar Laboratories, Inc.), 08 August, 1996 (08.08.96) & US, 5502068, A & EP, 800390, A1 & JP, 11-500427, A	1-10
A	NANCY L. FREGEAU, YUQIANG WANG, RICHARD T. PON, WILLIAM A. WYLIE, J. WILLIAM LOWN, "Characterization of a CPI-Lexitropsin Conjugate-Oligonucleotide Covalent Complex by <sup>1</sup> H NMR and Restrained Molecular Dynamics Simulation", Journal of the American Chemical Society, 1995, Vol.117, No.35, p.8917-8925	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 April, 2000 (13.04.00)Date of mailing of the international search report  
25 April, 2000 (25.04.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP00/01461

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 1-4,6-10  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  

Although the contents of the description and common general technical knowledge at the point of the application are taken into consideration, it cannot be technically understood what substantial meanings the compounds having the general formula B-L-A and being capable of simultaneously cleaving two strands of DNA have. Thus, International Search has been practiced exclusively on compounds 7a/7b (as set forth in claim 5), which can be understood based on the contents of the description, and methods and medicinal compositions with the use of these compounds.
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/01461

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C07D487/04, A61K31/407, 31/4178, A61P35/00, 43/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C07D487/04, A61K31/407, 31/4178, A61P35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN)

REGISTRY(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A, P	NOBUYOSHI AMISHIRO, SATORU NAGAMURA, EIJI KOBAYASHI, AKIHIKO OKAMOTO, KATSUSHIGE GOMI, HIROMITSU SAITO, "Synthesis and Antitum or Activity of Duocarmycin Derivatives:A-Ring Pyrrole Compounds Bearing 5-Membered Heteroarylacryloyl Groupes", Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1999, Vol. 47, No. 10, p. 1393-1403	1-10
A	WO, 97/44000, A2 (PANORAMA RESEARCH INC) 27. 11月. 1997 (27. 11. 97) & US, 5843937, A	1-10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

13. 04. 00

## 国際調査報告の発送日

25.04.00

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官(権限のある職員)

吉住 和之

印

印

4P

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPOO/01461

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	WO, 96/23497, A1 (シンファー ラボラトリーズ インコーポレーティッド) 8. 8月. 1996 (08. 08. 96) & US, 5502068, A & EP, 800390, A1 & JP, 11-500427, A	1-10
A	NANCY L. FREGEAU, YUQIANG WANG, RICHARD T. PON, WILLIAM A. WYLIE, J. WILLIAM LOWN, "Characterization of a CPI-Lexitropsin Conjugate-Oligonucleotide Covalent Complex by <sup>1</sup> H NMR and Restricted Molecular Dynamics Simulation", Journal of the American Chemical Society, 1995, Vol. 117, No. 35, p. 8917-8925	1-10
A	WO, 98/03509, A1 (協和醸酵工業株式会社) 29. 1月. 1998 (29. 01. 98) & AU, 9734631, A1	1-10

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2.  請求の範囲 1-4、6-10 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
明細書の記載や出願時の技術常識を考慮しても、一般式B-L-Aを有しかつDNA二本鎖を同時切断できる化合物がどのような実体のものであるのかが技術的に理解できない。明細書の記載から理解できる化合物7a/7b（請求項5のもの）とそれを使用する方法、医薬組成物については国際調査を行った。
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。